Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

Untersuchungen der Corneä-Oberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Gertrud Boeck, geb. Förster
aus Brilon

Marburg/Lahn 1973

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

Untersuchungen der Cornea-Oberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von
Gertrud Boeck, geb. Förster
aus Brilon

Marburg/Lahn 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dissertation angenommen: 18.12.1973
Fachbereich Humanmedizin
Gedruckt mit Genehmigung des Dekans.

Dekan: Prof. Dr. Oepen
Referent: Prof. Dr. Reim
Coreferent: Prof. Dr. Straub

INHALTSVERZEICHNUNG

I. Einleitung 1

A. Histologische und elektronenmikroskopische Beschreibung der Cornea 2

B. Verschiedene Versuche nach Cryoapplikation 9

II. Fragestellung 14

III. Methode 15

A. Kurze Beschreibung des Rasterelektronenmikroskops (" Stereoscan ") 15

B. Fixation der Präparate 17

IV. Ergebnisse 19

A. Darstellung von Epithel und Endothel mit verschiedenen Präparationsmethoden 19

B. Untersuchung der Cornea - Oberflächen nach Vereisung in vivo 36

V. Diskussion 41

VI. Zusammenfassung 44

VII. Literaturverzeichnis 46

I. EINLEITUNG

Die Tunica externa sive fibrosa des Auges setzt sich zusammen aus der durchsichtigen Cornea (Hornhaut), die etwa das vordere Sechstel des Augapfels einnimmt, und der sehr derben, undurchsichtigen Sklera (Lederhaut). Sie gibt dem Auge eine feste, aber trotzdem elastische Stütze. Mit Ausnahme der Cornea, die ein Teil des optischen Systems des Auges ist, umgibt die Sklera den gesamten Augapfel.

Die drei wichtigsten Eigenschaften, die der optischen Funktion der Hornhaut Rechnung tragen, sind ihre Durchlässigkeit, ihr etwas erhöhter Brechungsindex und ihre gewölbten Oberflächen.

Die Transparenz der Cornea hängt von dem Grad der Wassereinlagerung ab; vermehrte Hydratation führt zu Quellung und Verlust der Transparenz. Man kann dies zeigen, wenn man die Hornhäute auf oder unter 0° C abkühlt, und anschließend wieder langsam erwärmt. Um die normalen Hydratationsverhältnisse zu erhalten, und um auch für ihre Ernährung zu sorgen, muß die Cornea relativ große Mengen von Flüssigkeit und Metaboliten durch die Zellschichten schleusen, die ihre Struktur ausmachen.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, weist die Cornea eine spezielle Art und Weise des histologischen Aufbaus auf. Sie ist nach außen hin von einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel überkleidet, das sich durch eine Basalmembran von der Bowman'schen Membran abgrenzt. Darauf folgt das Hornhautstroma, dem sich die Descemet'sche Membran anschließt. Diese wiederum ist von einem einschichtigen Endothel überzogen, welches die Hornhaut zur Vorderkammer hin abgrenzt.

Die normale Kaninchenhornhaut hat eine Dicke von ungefähr 0,41 mm. Davon fallen etwa 90 % auf das Stroma. Das Epithel ist etwa 35 -

40 µ dick, die Descemet-Membran etwa 8 - 10 µ und das Endothel 3,5 - 5 µ. Die Existenz einer deutlichen Bowman'schen Membran ist beim Kaninchen zweifelhaft; jedoch befindet sich unter dem Epithel eine deutliche Basalmembran, die eine Breite von ca. 100 - 200 Å hat. (KAYE und PAPPAS 1962)

I A. Histologische und elektronenmikroskopische Beschreibung der Cornea

EPITHEL

Die Epithelzellen sitzen einer eigenen Basalmembran auf, die etwa 100 - 300 Å dick ist und aus feinen, dicht gepackten Filamenten zu bestehen scheint. (JAKUS 1961) Von dort aus schieben sich die Zellen langsam zur Oberfläche vor. Dabei verändern sie sich in Funktion und Form. (HANNA u. O'BRIEN 1962) Auch nimmt bei dieser Wanderung zur Oberfläche die Anzahl der Zellorganellen stetig ab. (CALMETTES et al. 1956)

Nach dem verschiedenartigen Aufbau kann man die Epithelzellen in eine Basalzellschicht, eine Schicht der Flügelzellen und eine Schicht der oberflächlichen Zellen einteilen. (PEDLER 1962)

Das feingranulierte Nucleoplasma der Basalzellen ist in dichten Anhäufungen um die innere Oberfläche der rundlichen Kernmembran angeordnet - im Gegensatz zu den Nuclei der Oberflächenzellen, die häufig Einstülpungen und Unregelmäßigkeiten der Kernmembran zeigen.

Das Cytoplasma der Flügelzellen enthält weniger Mitochondrien; und die intrazellulären Granula beginnen eine Ausrichtung zu Fibrillen zu zeigen.

Die Oberflächenzellen zeigen markante Unterschiede zu ihren Vorgängern. Das Cytoplasma ist zu Tonofibrillen zusammengetreten, die sich in einer scheinbar ziellosen Art vereinen und überkreuzen. Lediglich in der der Zellwand nahe liegenden Zone neigen sie dazu, sich parallel zum Zellrand auszurichten. (PEDLER 1962)

Das Epithel ist arm an Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien - zwei cytoplasmatischen Komponenten, die mit Metabolit-

stoffwechsel verbunden sind. (JAKUS 1961) Ein Golgi-Komplex und intrazelluläre Filamente von 50 - 200 Å Durchmesser sind regelmäßig ausgebildet. (TENG 1962) Letztere sind in den basalen Zellschichten mehr vertikal, in den oberen - wie schon oben erwähnt - mehr tangential in Bündeln angeordnet; sie stehen mit Haftplatten (Desmosomen) in Verbindung. (JAKUS 1961),(AONO 1961, KAYE u. PAPPAS 1962) Im Querschnitt besteht jedes Desmosom aus einem Paar dichter Plaques, von denen jedes das Ende dieser cytoplasmatischen Fibrillenbündel zu sein scheint. (JAKUS 1961)

Die Desmosomen sind an der Basalmembran häufiger und besitzen eine komplexere Struktur als anderswo. An der freien Oberfläche des Epithels beschreibt PEDLER (1962) eine Reihe von abgerundeten Fortsätzen, die er als die bleibende Komponente von Desmosomen versteht, die vorher mit Zellen verbunden waren, die vom Tränenfilm abgeschwemmt worden sind.

Die meisten oberflächlichen Zellen haben einen Längsdurchmesser von etwa 20 - 30 µ. Dazwischen findet man jedoch auch kleinere Zellen, die jüngere Zellen sein könnten, die im Laufe der o. a. physiologischen Regeneration nach oben gewandert sind.

Färbungs- und Größendifferenzen zwischen den Basalzellen veranlaßten BINDER (1951), hellere und breitere "Matrix-Zellen" von dunkleren und schmaleren "Substanz-Zellen" zu unterscheiden. Er nahm an, daß den stationären "Matrix-Zellen" die mitotische Zellerneuerung obliegt, während die "Substanz-Zellen" nach und nach von der Basalmembran gelöst und in Richtung der Epitheloberfläche gedrängt werden.
Bei ihrer Untersuchung der Hornhaut-Oberfläche mit dem Stereoscan beschrieben BLÜMCKE und MORGENROTH (1967) dicht angeordnete Mikrovilli und Mikroplicae auf den Oberflächenzellen. Ebenso wie AONO (1961) und PEDLER (1962) nahmen sie an, daß diese Ausstülpungen für das Haften des Tränenfilms und somit für die Ausbildung einer gleichmäßig gekrümmten Oberfläche bedeutungsvoll sind.

Nach der unterschiedlichen Anzahl und Mustern der Mikroplicae und Mikrovilli - die die wechselnde Oberfläche der Epithelzellen ausmachen - unterschieden HOFFMANN und DUMITRESCU (1970) helle,

mittlere und dunklere Zellen.

Die dunkleren, fast runden Zellen bedecken eine größere Fläche als die helleren und mittleren Zellen und zeigen im Gegensatz zu diesen im allgemeinen den Eindruck eines Zellkerns. Die helleren Zellen erwecken den Eindruck, als füllten sie nur mehr oder weniger die Lücken zwischen den dunklen Zellen aus.

HOFFMANN(1971) nimmt deshalb an, daß die größeren dunkleren Zellen die älteren Substanz-Zellen sind, während die kleineren hellen Zellen diejenigen sind, die die Oberfläche gerade mit einem mehr oder weniger großen Zipfel ihrer Zellmembran erreicht haben.

TILGNER, HEYDENREICH und ECKERTbeschrieben 1969 im ausdifferenzierten Hornhaut-Epithel neben den Epithelzellen im engeren Sinne Zellen, die durch Silberimprägnation selektiv geschwärzt werden. Diese "polygonalen Zellen" sind vielgestaltig und mit Fortsätzen versehen. Sie kommen einzeln oder zu Strängen vereinigt vor und werden vorzugsweise innerhalb der basalen Schichten des Hornhaut-Epithels angetroffen, kommen aber auch in der unteren Flügelzellschicht vor. Über ihre Fortsätze scheinen sie eng, aber nicht syncytial verbunden zu sein. Teilungsfiguren konnten nicht beobachtet werden.
Ihre Anordnung kann mit einem dreidimensionalen Netzwerk verglichen werden, dessen Lücken durch nicht argyrophile Epithelzellen ausgefüllt werden.

Ein wesentliches Merkmal der "polygonalen Zellen" ist ihre Schwärzung durch Silbersalze. Diesen Imprägnationsmethoden, der Vitalfärbung mit Brillantkresylblau, der PAS-Reaktion und guten HE-Färbungen ist gemeinsam, daß sie die "polygonalen Zellen" dunkler darstellen als die Nachbarschaft.
Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Zellen epithelialen Types von bestimmter Funktion oder eines bestimmten Funktionszustandes.

BOWMAN'SCHE MEMBRAN (LAMINA LIMITANS ANTERIOR)

Die Bowman'sche Membran ist zellfrei und läßt sich färberisch und elektronenmikroskopisch deutlich von der dem Epithel zugehörigen Basalmembran abgrenzen. Sie wird definiert als eine modifizierte Stromaschicht und besteht aus feinsten Fibrillen (140 - 160 Å), die ein unregelmäßiges Geflecht bilden. (JAKUS 1961, TENG 1962)

Die Bowman'sche Membran kommt nur bei höheren Primaten vor, während die Basalmembran bei allen Wirbeltieren vorhanden ist. (KAYE und PAPPAS 1962, ROHEN 1964)

STROMA CORNEAE (SUBSTANTIA PROPRIA)

Das Hornhautstroma besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen, die in Lamellen gebündelt sind und sich schichtweise überkreuzen. Elektronenmikroskopisch zeigt sich, daß diese kollagenen-Fasern innerhalb der einzelnen Lamellen parallel angeordnet und in eine Kittsubstanz (Matrix) eingebettet sind.
Die durchschnittliche Fibrillendicke liegt etwa bei 290 Å, die Querstreifungsperioden liegen im Mittel etwa bei 600 Å.
(SCHWARZ 1953)

Während die Sklerafibrillen (Dicke zwischen 28 und 280 m/u, Querperioden im Mittel bei 80 m/u) weitgehend mit den Fibrillen des Sehnenkollagens übereinstimmen, stellen die Corneafibrillen einen besonderen Fibrillentyp dar, der sich in gewissen Punkten von jedem anderen Fibrillentyp unterscheidet - abgesehen vielleicht vom embryonalen Gewebe.

Die Transparenz der Substantia Propria ist nur dann möglich, wenn die Fibrillen dadurch maskiert werden, daß Kittsubstanz und Fibrillen annähernd den gleichen Brechungsindex besitzen. Um diese Maskierung der Fibrillen zu gewährleisten, muß die Cornea einen bestimmten Mittelwert der Wassereinlagerung einhalten. (SCHWARZ 1953) Bei der Hornhautschwellung ändern sich Struktur und Dicke der Fibrillen nicht; es scheint lediglich die Grundsubstanz zu quellen.

Zwischen den zu Lamellen gebündelten Kollagenfibrillen liegen die sog. fixen Hornhautzellen oder Stromazellen - langgestreckte, verzweigte Elemente mit wenig Cytoplasma; sie bilden ein zusammenhängendes Netz innerhalb des Stromas. (ROHEN 1964)

DESCEMET'SCHE MEMBRAN (LAMINA LIMITANS POSTERIOR)

Die Descemet'sche Membran kann als eine hypertrophierte und speziell aufgebaute Basalmembran betrachtet werden. Sie ist aus charakteristisch orientierten Eiweißfibrillen, Lipoidstrukturen und Elastin enthaltenden interfibrillären Substanzen aufgebaut. Daher ist sie sehr elastisch und widerstandsfähig - sie kann eine Zeitlang allein dem intraocularen Druck standhalten.

JAKUS (1956, 1961) beschreibt die Descemet'sche Membran als regelmäßige, fibrillär-lamelläre Struktur. Zweidimensional angeordnete Knötchen werden durch internodale Filamente so verknüpft, daß sich eine regelmäßige hexagonale Figur ergibt. Die Filamente messen etwa 100 Å, die Knötchen 270 Å und die Abstände zwischen ihnen betragen im Durchschnitt 1070 Å.

Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop haben ergeben, daß die Descemet'sche Membran eine charakteristische Doppelbrechung der submikroskopischen Lamellenstrukturen zeigt. Die Lipoidstrukturen sind querorientiert und bilden zwischen den längsorientierten Eiweißfibrillen zwei selbständige Schichten. (BAUD und BALAVOINE 1952)

Aufgrund der Silberaffinität unterscheiden FEHER und VALU (1969) dreierlei Bindegewebsfibrillen in der Descemet'schen Membran:

1.) nicht versilberbare Elemente, die dem Endothel bzw. dem Parenchym anliegen
2.) argyrophile Elemente, die sich ähnlich versilbern lassen wie kollagene Fasern
3.) Fibrillen, die wie die Gitterfasern zu versilbern sind, die in der inneren argyrophilen Schicht liegen.

Polarisationsoptische Untersuchungen konnten die Lamellierung

der Descemet'schen Membran deutlich bestätigen. Von den fünf Schichten zeigen drei positive, zwei dagegen negative Doppelbrechung. Die einzelnen positiv und negativ doppelbrechenden Lamellen stellen sich wechselweise dar; die nach dem Endothel bzw. Parenchym zu liegenden Schichten sind negativ. (FEHÉR u. VALU 1969)

Der größte Teil der Dehydratationsprozesse, die für die Transparenz der Hornhaut wichtig sind, spielen sich durch die Descemet'sche Membran ab. Auch führt der Weg der verschiedenen Metabolittransporte zwischen Vorderkammer und Parenchym durch die Membran. Daher kann man annehmen, daß bei diesen Prozessen der Descemet'schen Membran eine große Bedeutung zukommt. (ROHEN 1964)

In der Nähe des Kammerwinkels fasert sich die Descemet'sche Membran in mehrere Lamellen auf. Diese strahlen ins Trabekelwerk ein und verflechten sich dort mit den kollagenen Bündeln des Trabekulums. (ROHEN 1964)

Polarisationsoptische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß die Lipoidelemente des Trabekelsystems aus der Descemet'schen Membran stammen. Damit ist gezeigt, daß eine enge Verbindung der subendothelialen Schicht des Trabekulum corneosklerale und der Descemet'schen Membran besteht. (FEHÉR und VALU 1969)

ENDOTHEL

Das Endothel ist eine schmale Zellschicht, die sich an die Descemet'sche Membran anschließt und die Cornea zur Vorderkammer hin abschließt.

Die basale Plasmamembran des Endothels - die mit der Descemet-Membran in Berührung steht - erscheint irgendwie dichter als die apikale Plasmamembran und zeigt häufig Verdickungen, die den desmosomalen Strukturen zwischen Epithel und seiner Basalmembran ähneln. (KAYE und PAPPAS 1962)

Die Endothelzellen überlappen sich dachziegelartig oder sind -

vor allem in ihren apikalen Bereichen - durch ein verwickeltes System von zierlichen Falten miteinander verzahnt. (STAUBESAND 1962)
Untereinander stehen die Zellen durch Desmosomen und Berührungszonen vom Typ I (Sjöstrand) in Verbindung. Letztere erscheinen nie nahe der Descemet'schen Membran, sondern in der Regel unter dem Rand zur Vorderkammer hin. (BLÜMCKE und MORGENROTH 1967)

Für Transportvorgänge am Endothel kommen zwei Möglichkeiten im Betracht:

1.) der transzelluläre Transport durch Pinocytose oder Cytopempsis
2.) der interzelluläre Transport durch die Saftspalten des Endothels. (ROHEN 1964)

Im Cytoplasma der Endothelzellen finden sich neben Mitochondrien und Golgi-Apparat auch zahlreiche pinocytotische Bläschen. Auch sind taschenartige Einfaltungen der oberflächlichen und tiefen Zellmembranen nicht selten, so daß man daraus schließen kann, daß ein aktiver endothelialer Stofftransport durch Membranvesikulation zwischen Vorderkammer und Substantia Propria der Cornea besteht. (STAUBESAND 1962)

BLÜMCKE und MORGENROTH (1967) nehmen übereinstimmend mit anderen Autoren an, daß die o. a. Berührungszonen die Aufgabe haben, den Austausch von interzellulärer Flüssigkeit entlang der Interzellularspalten einzuschränken oder zu verhindern. Das hieße in diesem Fall, daß die Berührungszonen eine Barriere für den interzellulären Substanzaustausch zwischen Cornea und Vorderkammer darstellen.

Damit kann ein transzellulärer Stofftransport durch Pinocytose oder Cytopempsis als gesichert angenommen werden.

I B. Verschiedene Versuche nach Cryoapplikation

Die ersten Versuche einer umschriebenen, kurzfristigen Kälteapplikation reichen bis ins vorige Jahrhundert zurück. Man entdeckte den Vorzug einer begrenzten Wundfläche bei geringer Blutungsneigung, flacher Verschorfung und guter Heilungstendenz.
Die erste größere Arbeit über Kälteversuche in der Augenheilkunde stammt von WESSELY (1918). Er benutzte für seine Arbeiten an der Cornea eine trichterförmige Metallglocke, die an ihrer Basis (7 mm ∅) eine leicht konkave Wölbung aufwies. Als Kältegemisch nahm er Kohlensäureschnee oder mischte Schnee mit Salz.
Bei einer 30 Sekunden dauernden Vereisung entdeckte er, daß beim Epithel die Interzellularräume sich verbreitert hatten. Das Cytoplasma zeigte Vakuolenbildung und verminderte Anfärbbarkeit. Auch die Kerne zeigten Veränderungen im Farbverhalten. Insgesamt schien sich das Epithel bis auf eine Schicht kubischer Zellen - die jedoch größer waren als normal - gestreckt zu haben. Über Veränderungen am Endothel machte er keine Angaben.
Bei der Regeneration des Epithels beschreibt er eine Verdickung der Zellschicht mit dem Auftreten von charakteristischen vielkernigen Riesenzellen, deren Entstehung er durch amitotische Teilung erklärt, da er kaum Mitosen nachweisen konnte.

In neuerer Zeit haben auf diesem Gebiet MAUMENEE und KORNBLUETH (1948, 1949) gearbeitet. Sie benutzten für ihre Versuche einen 45 cm langen Metallstab (19 mm ∅), den sie durch Eintauchen in absoluten Alkohol und Kohlensäureschnee auf minus 78 ^{o} C abgekühlt hatten.
Nachdem die Cornea wieder enteist war, erschien sie zunächst wieder völlig klar - ein Ödem trat erst nach 2 - 3 Stunden auf und war abhängig von der Einwirkungszeit der Vereisung.
Je nach Dauer der Kälteeinwirkung zeigten sich entsprechend verschiedenartige histologische Bilder: z. B. werden 5 min nach einer 3 sec dauernden Kälteeinwirkung Epithellücken im Bereich der Vereisungszone beschrieben.
Zellnekrosen beschrieben die Autoren im Bereich des Endothels:

über große Flächen hinweg war es von der Descemet'schen Membran gelöst. Nach etwa 6 Stunden waren im Bereich der Vereisungszone keine Endothelzelle mehr nachweisbar.
Durch das hauptsächlich im Stroma sich entwickelnde Ödem war die Cornea auf ein Dreifaches ihrer normalen Dicke angeschwollen.
MAUMENEE und KORNBLUETH beobachteten nach 20 bis 24 Stunden einen Beginn einer Regeneration des Epithels und Endothels.
Im Gegensatz zu WESSELY beschrieben sie dabei zahlreiche deutliche Mitosen. Nach ihren Angaben ist das Epithel bereits nach 12 oder 24 Stunden völlig regeneriert, während beim Endothel die Zellen erst nach etwa 4 Tagen damit begannen, ihre normale Gestalt anzunehmen.

Zu den gleichen Ergebnissen kamen in den folgenden Jahren auch SUDARSKY, HULQUIST und CHI (1965) und CHESKES und HENDERSON (1966): Auftreten eines Corneaödems nach ca. 2 Stunden, Regeneration des Epithels je nach Ausdehnung und Tiefe der Läsion nach 24 - 36 Stunden und Wiederherstellung des Endothels zwischen 24 - 48 Stunden und 2 - 4 Tagen.
Die Regeneration erfolgte dabei in allen Zellagen vom Rand her.

Auch bei den Versuchen von SOMMERVILLE und SHEA (1966) trat nach einigen Stunden ein Corneaödem auf, wobei sich die Hornhaut auf ein Dreifaches ihrer normalen Dicke vergrößerte.
In der Descemet'schen Membran beschrieben die Autoren eine auftretende Fältelung als einzige Veränderung.
Fünf Minuten nach Vereisung zeigten sich histologisch die ersten Endothelschäden: die Zellen wurden flacher und einige lösten sich von der darunterliegenden Descemet'schen Membran. Nach 1 Stunde waren die Veränderungen soweit fortgeschritten, daß größere Endothelflächen fehlten. Nach Ablauf von 5 Stunden war eine deutliche Fragmentierung der Zellkerne zu sehen; und nach etwa 24 Stunden begannen die ersten Endothelzellen zur geschädigten Fläche hinzuwandern.

CHI und KELMAN (1966) unternahmen den Versuch, das Endothel in vivo zu fixieren, indem sie 10 %-ige Formalinlösung in die Vorderkammer injizierten.

Als erste Veränderungen nach Vereisung beschrieben sie eine Verkleinerung der aber noch normal geformten Kerne mit Verdichtung ihrer Chromatinstruktur. Ebenso wie die o. a. Autoren beobachteten sie eine völlige Zerstörung des Endothels im Bereich der Kälteapplikationsfläche. Dabei fielen ihnen einige normale Zellinseln auf, die sie mit der anschließenden Regeneration in Verbindung brachten.

Alle diese jetzt beschriebenen Veränderungen im Bereich des Epithels und Endothels werden auch von anderen Autoren beschrieben. (TOST, FUHRMEISTER und SCHULZ 1965; TOST, SCHULZ und SELISKO 1968; REIM, LIPP und VENSKE 1970).

Ähnlich wie bei unseren Versuchen brachten FAURE et al. flüssigen Stickstoff (- 196 ^{o} C) direkt auf die Hornhaut der Versuchstiere auf. (Applikationsdauer: 20 sec).
Das Ergebnis ihrer Untersuchungen war in den ersten Stunden nach Vereisung eine Kontraktion der Zellkerne, eine Steigerung ihrer Anfärbbarkeit durch Chromatinverdichtung und das Auftreten von Vakuolen. Das Zellplasma erschien Lückenhaft und zerfetzt.
Ebenso wie CHI und KELMAN beschrieben sie auf der von Endothel entblößten Fläche stehengebliebene Zellinseln, die sie als Ausgangspunkt für die Zellregeneration ansahen.

Diese Regeneration kommt durch häufige Mitosen zustande. Da jedoch das Zellplasma sich nicht so schnell teilt wie die Kerne, kommt es zum Auftreten von vielkernigen Zellen. Diese Mitosetätigkeit läßt rasch nach - nach 3 Tagen sind kaum noch Zellteilungen nachweisbar. Die entstandenen vielkernigen Riesenzellen verbinden sich später untereinander und sind noch Monate später im regenerierten Endothel nachweisbar. Nach fast einem Jahr hat das Endothel noch immer nicht seine normale Struktur wiedergefunden.

Verschiedene Vereisungstechniken benutzten POULIQUENet al.1971 bei ihren Versuchen; und zwar setzten sie beim rechten Auge die Cryöde schon in gefrorenem Zustand auf, beim linken Auge dagegen wurde sie unter feuchter Wärme aufgesetzt und dann abgekühlt.

Anschließend wurden die Hornhäute in verschiedenen Abständen vom Zeitpunkt der Kälteapplikation fixiert und licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.
Bei einer sofort nach Vereisung erfolgenden Fixierung beschrieben sie nur Veränderungen im Epithel. Die Zellen erscheinen gestreckt und zugespitzt, und die Zellagen scheinen sich zu einer einzigen zu reduzieren.
Die Descemet'sche Membran und das Endothel zeigen keine Veränderungen.
Nach 24 Stunden war das Epithel deutlich verschmälert und zeigte einige intrazelluläre Vakuolen, aber keine Mitosen.
Die Basalmembran des Epithels war unregelmäßig mit einigen tiefen Rauigkeiten.
Das Endothel zeigte nach dieser Zeit am rechten Auge kaum Veränderungen; links jedoch waren im Zentrum der Vereisungsfläche keine Zellen mehr vorhanden.

Elektronenmikroskopisch sind nach 24 Stunden im Epithel die Interzellularräume vergrößert, das Cytoplasma ist verdichtet und die Kerne sind deformiert. Später kommt es dann hauptsächlich bei den basal liegenden Zellen zum Auftreten eines perinukleären Hofes.
Im Bereich der oberflächlichen Zellen sind die Interzellularräume vergrößert und die auf der Epitheloberfläche befindlichen Mikrovilli werden rar.
Wie auch schon bei den lichtmikroskopischen Versuchen beschrieben, sind die Kälteschäden am Endothel enorm. Die Hauptveränderungen sind in den Zellkernen zu finden: es kommt zu Kernpyknose, Karyolyse oder Karyorrhexis. Das Cytoplasma erscheint netzartig zerfetzt.
Beim Stroma beschreibt POULIQUEN zwei Arten von Schädigungen: einmal diejenigen, die Folge einer direkten Schädigung der Keratocyten sind und zum anderen diejenigen, die Folge von Endothelschäden sind. Dabei bemerkte er ebenso wie CHI und KELMAN, daß die Keratocyten viel resistenter sind als die Endothelzellen; daher sind im ersten Fall die Läsionen geringer.
Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine Vergrößerung des Endo-

plasmatischen Retikulums, wahrscheinliche Vakuolisierung der Mitochondrien und Zähnelung des Kernes mit Vergrößerung des perinukleären Raumes.

Schäden im Epithel unmittelbar nach einer Vereisung hat auch TANAKA (1963) im Elektronenmikroskop beobachtet:
Konzentration der Kernsubstanz mit Deformierung der Kerne, auftretende Vakuolen im Protoplasma und Konzentration der Mitochondrien. Eine Verdickung der Kernmembran war etwa einen Monat lang nachweisbar. Beim Endothel beschrieb er Veränderungen und Vergrößerung der Interzellularräume und intrazelluläre Vakuolen.
(Leider liegt diese wichtige Arbeit nur im Referat vor.)

Aus diesen ganzen Versuchen kann man folgern, daß es einer Schädigung des Endothels bedarf, um nach Cryoapplikation ein Corneaödem hervorzurufen.
Wenn die betroffene Fläche klein ist (z. B. bei Kontakt mit einem Applikator mit geringem Durchmesser) oder nicht vollständig von Endothelzellen entblößt ist (Bestehenbleiben von Zellinseln), dauert die Wiederherstellung der Cornea 3 - 7 Tage. Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, dauert die Regeneration erheblich länger.

II. FRAGESTELLUNG

In der Ophthalmologie wird schon seit längerer Zeit Kälte zu den verschiedensten Zwecken benutzt.
So findet Kälte z. B. Anwendung bei Operationen oder bei der Konservierung der für Transplantationen bestimmten Hornhäute; ebenso wird Kälte auch in der Therapie angewandt. (KRWAWICZ 1961; STRAUB und REIM 1966/67)
Über die Veränderungen, die durch Kälte in den Strukturen der Cornea erzeugt werden, besitzen wir viele histologische Befunde und einige transmissionselektronenmikroskopische Beobachtungen. Es war jedoch bisher noch nicht bekannt, welche Veränderungen an den Oberflächen der Cornea nach einer Vereisung auftreten.

Aus diesen Gründen heraus fanden wir es Interessant zu erfahren, inwieweit durch Kälte Veränderungen an Epithel und Endothel der Cornea entstehen.
Zu dieser Fragestellung liegen bereits einige biochemische Untersuchungen vor. (REIM, LIPP und VENSKE 1970; REIM, BOECK, KRUG und VENSKE 1972; REIM und SCHMIDT 1967)

Es ist nach diesen Experimenten und aus der Tatsache, daß nach einer Vereisung ein Corneaödem entsteht, zu vermuten, daß Läsionen der Hornhautoberflächen auftreten, und daß insbesondere das Endothel verstärkt durchlässig für Kammerwasser wird.

Um zu den biochemischen und histologischen Untersuchungen auf diesem Gebiet noch die optischen hinzuzufügen, wurden die angefertigten Präparate mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Aufgrund dieser Überlegungen ergaben sich zwei Probleme:

1. Entwicklung einer Präparationsmethode zur genauen Darstellung der Corneaoberflächen (Epithel und Endothel)
2. Untersuchung der Cornea auf Kälteschäden

III. METHODE

A. Kurze Beschreibung des Rasterelektronenmikroskopes ("Stereoscan")

Zur Untersuchung der Präparate wurde das Rasterelektronenmikroskop Stereoscan Mk II A (Cambridge Instruments Co. Ltd.) benutzt.
Die Bedeutung des Rasterelektronenmikroskopes (REM) liegt darin, daß es die Direktabbildung von Oberflächen und oberflächennahen Schichten von nahezu beliebig rauher Beschaffenheit - auch von massiveren Stücken - mit großer Tiefenschärfe und gleichzeitig mit hoher Auflösung ermöglicht; während im Durchstrahlelektronenmikroskop nur dünne Schnitte untersucht werden können.

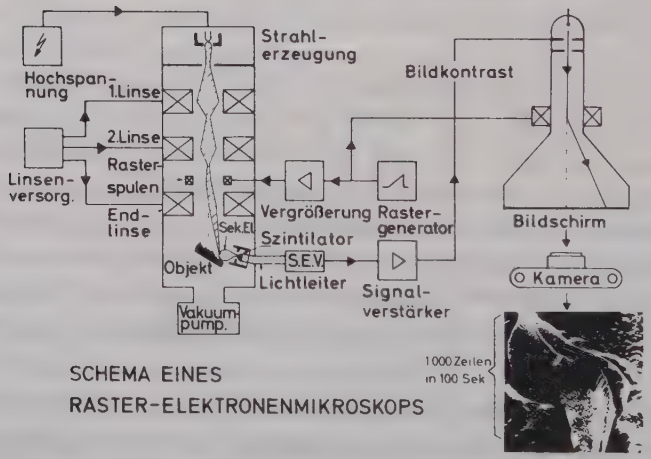
Das Prinzip des REM ist etwa folgendermaßen:
Im Kopf des hochevakuierten Gerätes wird ein Elektronenstrahl bei einem engsten Bündeldurchmesser von etwa 0,1 mm mit 1 - 3o kV beschleunigt. Durch drei elektromagnetische Linsen fokussiert, trifft der Elektronenstrahl mit einem Durchmesser von 5o - 1oo Å auf das Präparat auf. Der Strahl wird elektromagnetisch so abgelenkt, daß er das Präparat in 1000 Zeilen (bei einstellbarer Zeilenlänge) mit je 1000 Bildpunkten pro Zeile abtastet. Der Rastergenerator, der die Strahlablenkung steuert, ist mit den Ablenkspulen einer Kathodenstrahlröhre gekoppelt, so daß sich der Kathodenstrahl auf dem (rechteckigen) Bildschirm jeweils an der gleichen Stelle befindet wie der Elektronenstrahl des Gerätes auf dem Präparat.

Der auf das Präparat auftreffende Elektronenstrahl wird zu einem Teil zurückgestreut (RE), zum anderen löst er aus der Oberfläche des Präparates Sekundärelektronen (SE) heraus. Die Oberfläche des Präparates wird daher bis zur halben Eindringtiefe abgebildet. Zahl und Energie der RE und SE hängen u. a. von der Art des Präparates ab.

Die SE werden durch eine positive Spannung auf einen Scintillator

gelenkt. Dort erzeugen sie Photonen, die über einen Sekundärelektronen-Verstärker (SEV) wiederum das elektrische Signal erzeugen, das die Helligkeit des Bildschirmes steuert.
Von den RE wird nur der Teil genutzt, der direkt auf den Szintillator gestreut wird, da sie wegen ihrer höheren Energie nicht durch das schwache positive Feld beeinflußt werden.
Der Kontrast des Bildes wird durch die Unterschiede der Sekundärelektronen - Emission hervorgerufen und hängt u. a. von der Neigung der Fläche zum Elektronenstrahl ab. Durch Kippen des Präparates lassen sich einfach Stereo - Aufnahmen herstellen.

Das Auflösungsvermögen des REM liegt mit 200 - 800 Å zwischen Licht- und Transmissionselektronenmikroskop; die Tiefenschärfe liegt zwischen 5 mm (bei einer Vergrößerung von 20 : 1) und 200 Å (bei 5o ooo : 1).
REIMER 1967, CHRISTENHUSS 1969/70)



SCHEMA EINES
RASTER-ELEKTRONENMIKROSKOPS

aus: "Mitteilungen - Kommentare - Berichte"
der Philipps-Universität Marburg/Lahn, Dez. 1969 (5)

B. Fixation der Präparate

1. Aldehyd - Fixation

Durch eine Fixierung wird angestrebt, die bald nach dem Tod einsetzenden autolytischen Vorgänge zu verhindern und die Zell- und Gewebestrukturen in möglichst natürlichem Zustand zu erhalten.
Eine ausgezeichnete Zellerhaltung zeigen Glutaraldehyd ($CHO-(CH_2)_3-CHO$) und Acrolein ($CH_2=CH-CHO$); die fixierende Wirkung erfolgt durch Methylierung der Eiweißkörper des Gewebes. Mit einer Osmiumsäure-Nachfixierung stellt Glutaraldehyd (GA) ein ausgezeichnetes Fixationsmittel dar.

Um eine gute Erhaltung der Feinstruktur zu gewährleisten, muß der pH von Fixationslösungen innerhalb enger Grenzen bleiben. Deshalb ist der Gebrauch von Pufferlösungen mit einem pH von 7,4 - welcher mit dem pH-Wert der tierischen Gewebe übereinstimmt - zu empfehlen.
Für "physiologische Puffer" hält man deswegen die Na-PO_4- Puffer, da sie in der Form von anorganischem Phosphat und Phosphatestern im Gewebe vorhanden sind. (MILLONIG 1962)

Zur Fixation der Präparate wurde als Aldehyd-Fixationsgemisch eine 3 % -ige Lösung von GA in 0,1 m PO_4- Puffer benutzt.(pH 7,2)

Herstellung des Na-K-PO_4- Puffers (100 mMol)

Na_2HPO_4 8,9 g/500 ml H_2O
KH_2PO_4 6,8 g/500 ml H_2O

Mischung: 500 ml Na_2HPO_4
130 ml KH_2PO_4 pH 7,2

Mit diesem Phosphatpuffer wurde die 25 %-ige Stammlösung von Glutaraldehyd auf 3 % verdünnt.

2. Osmiumsäure - Fixation

Das Prinzip des Phosphat-Puffers nach MILLONIG beruht auf dem Gleichgewicht zwischen Natriummonophophat und Natriumdiphosphat,

wenn NaOH zu einer isotonen Lösung des Ersteren gegeben wird. Durch Variation der NaOH-Konzentration kann der pH-Wert zwischen 5,4 und 8,0 verschoben werden, ohne daß die osmotische Konzentration sich ändert.

Herstellung des Puffers

Natriummonophosphat (2,26 %) ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	83 ml
NaOH-Lösung (2,52 %)	17 ml
H_2O	10 ml
Glucose	0,54 g
OsO_4	1,00 g

Bei der angegebenen NaOH-Menge ergibt sich ein pH von 7,3.

IV. ERGEBNISSE

A. Darstellung von Epithel und Endothel mit verschiedenen Präparationsmethoden

1. Versuch

Für die Versuche wurden Kaninchen vom Stamm "Deutscher Widder" benutzt. Die Tiere wurden mit 40 mg Nembutal pro kg Körpergewicht narkotisiert und bekamen anschließend die Augen enucleiert. Bei den enucleierten Augen wurden die Sklera in Höhe des Ciliarkörpers und der Glaskörper eröffnet und anschließend der ganze Augapfel in GA versenkt. Dabei wurde darauf geachtet, daß das Epithel unberührt blieb. Insgesamt verblieb der Bulbus 60 min im Fixierbad.
Anschließend wurden aus der Hornhaut parazentral gelegene Gewebestückchen exzidiert und mit Cyanacrylat-Kleber (Histoacryl) auf die Aluminiumnieten für den Stereoscan aufgeklebt.
Im Anschluß hieran wurden die Präparate 24 Stunden lang lyophilisiert. (Lyophilisiergerät der Firma Kniese, Marbach, nach Schnittger)

Die getrockneten Präparate konnten nun im Vakuum bei weniger als $5 \cdot 10^{-5}$ Torr mit Gold (100 - 200 Å dick) bedampft werden und wurden anschließend im REM untersucht.

Die Oberfläche des Endothels zeigt eine deutliche Markierung der Zellgrenzen und der Zellkörper. Die Interzellularräume sind etwas eingesunken. (Abb. 1)

Das Epithel war mit einer homogenen, teilweise aufgebrochenen Schicht bedeckt. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Tränenfilm. Auch hier fanden sich vereinzelte Erythrozyten. (Abb. 2 u. 3)
An einigen Stellen war der die Hornhaut bedeckende Film so weit aufgerissen, daß man durch die hochgefalteten Rißstellen die Zotten der Deckschicht des Corneaepithels sehen konnte. (Abb.4 u.5)

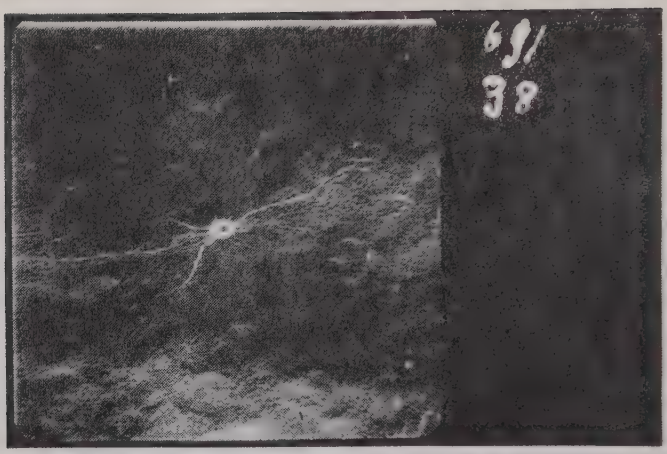


Abb.: 1 ENDOTHEL Vergr.: 1400 : 1

Die Zellen des Endothels sind deutlich zu erkennen. In Bildmitte befindet sich ein Erythrocyt mit Fibrinfäden.

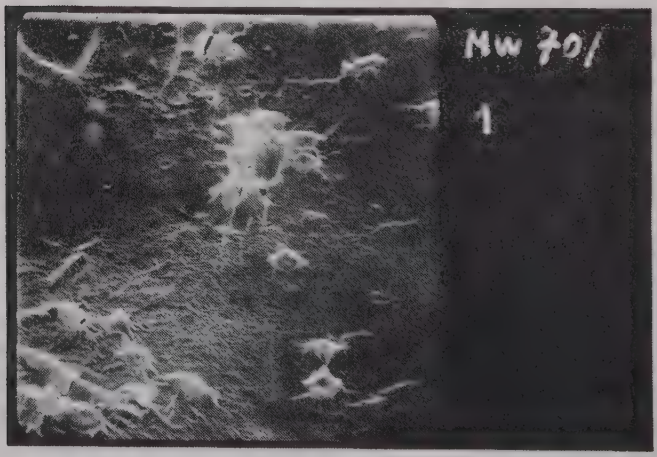


Abb.: 2 EPITHEL Vergr.: 700 : 1

Undeutlich zu erkennende Zellgrenzen. Über dem gesamten Präparat befindet sich eine homogene Schicht, die an mehreren Stellen von Erythrocyten emporgewölbt ist.

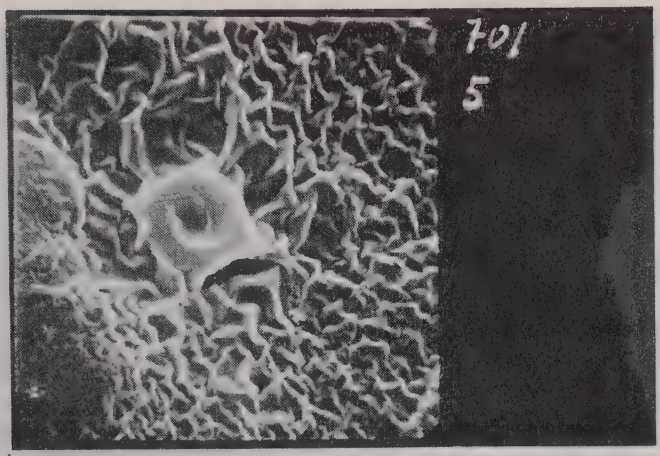


Abb.: EPITHEL Vergrößerung: 3400 : 1

Diese Abbildung zeigt einen der mit einem Film bedeckten Erythrozyten bei stärkerer Vergrößerung

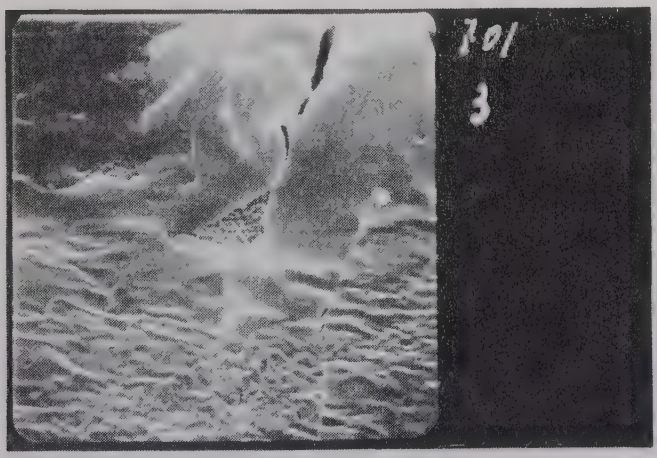


Abb.: 4 EPITHEL Vergrößerung: 3400 : 1

Durch den teilweise aufgerissenen Film kann man auf die Oberfläche des Epithels sehen; man erkennt dort die Zotten der Deckzellen.

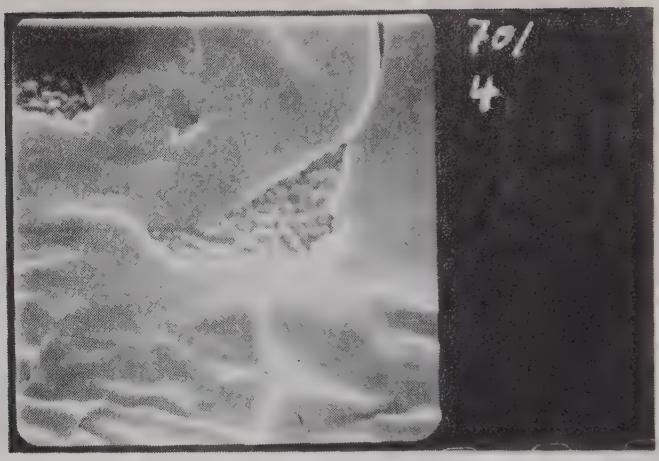


Abb.: 5 EPITHEL Vergrößerung: 7000 : 1
Die gleiche Stelle wie bei Abb. 4, jedoch stärker vergrößert.

2. Versuch

Da bei dem vorhergehenden Versuch der mitfixierte Tränenfilm eine einwandfreie Sicht auf die Oberfläche des Epithels unmöglich machte, wurde nun versucht, bei den bereits fixierten Präparaten den störenden Film mit Hilfe eines durch eine Kapillardüse geleiteten Luftstromes zu entfernen. (Abb. 6 - 8) Bei der mikroskopischen Betrachtung zeigte sich jedoch kein nennenswerter Effekt gegenüber dem vorhergehenden Versuch, so daß diese Methode wieder verlassen wurde.

3. Versuch

Das Ziel der Versuche war, die Zellstrukturen in ihrem physiologischen Zusammenhang zu erhalten.
Bei den vorhergehenden Versuchen, bei denen die Bulbi enucleiert und anschließend in GA getaucht worden waren, war es u. a. auch zu Schrumpfungen der Cornea gekommen.
Um den auf der Hornhaut haftenden Tränenfilm zu entfernen, begannen wir damit, die Augen noch in vivo ausgiebig mit NaCl -

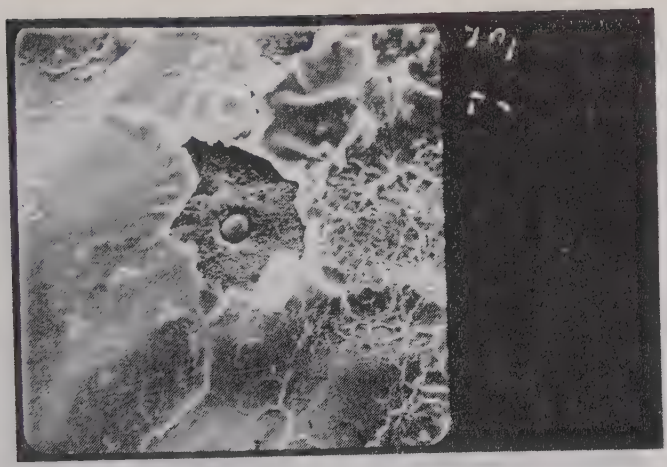


Abb.: 6 EPITHEL Vergrößerung: 2200 : 1

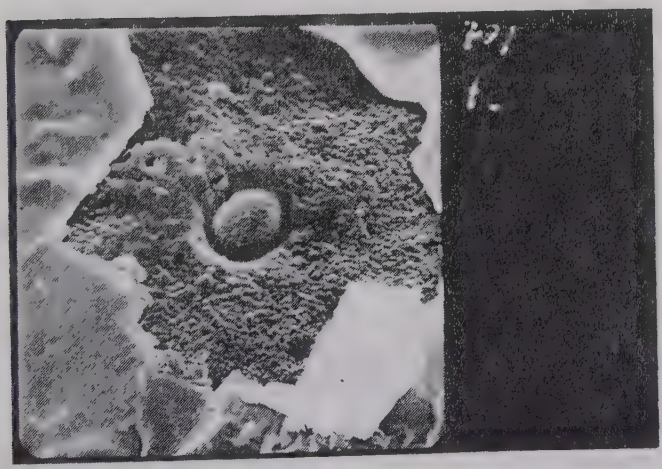


Abb.: 7 EPITHEL Vergrößerung: 5500 : 1

Die gleiche Stelle wie bei Abb. 6, 1 1/2 -fach vergrößert. Bei der Vertiefung in Bildmitte scheint es sich um den Eindruck eines Erythrozyten zu handeln.

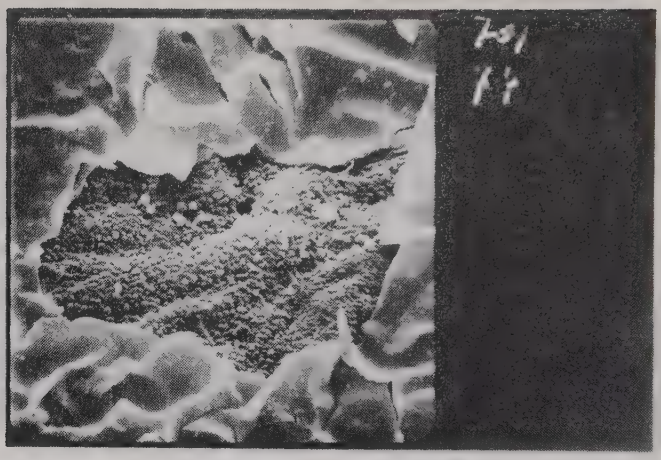


Abb.: 8 EPITHEL Vergrößerung: 2200 : 1

Eine andere Stelle des vorher beschriebenen Präparates. Zellgrenzen sind auch hier kaum zu erkennen.

Lösung (0,9 % -ig) zu spülen.

In der Annahme, daß Aldehyd ein ausgezeichnetes Fixiermittel ist und recht schnell in das Gewebe eindringt, und zudem die normale Kaninchenhornhaut eine Dicke von ca. 0,4 mm hat, war zu erwarten, daß die Cornea innerhalb recht kurzer Zeit fixiert sein müßte.

Deshalb wurde dazu übergegangen, die Augen noch i n v i v o zu fixieren.

Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Um die nach dem Spülen mit physiologischer NaCl-Lösung noch erhöhte Empfindlichkeit der Hornhaut und der Conjunktiven herabzusetzen, wurde zusätzlich Novesine in den Bindehautsack eingeträufelt.

Anschließend wurde t r o p f e n w e i s e GA-Puffer-Lösung (3 %-ig) auf die Hornhaut aufgebracht. Nach etwa 10 min begann sich die Pupille zu verengen, was als Zeichen dafür gewertet wurde, daß die Fixierung der Cornea erfolgt war und GA durch die Vorderkammer hindurch die Iris erreicht hatte.

Die klare, nun verhärtete, leicht bräunlich gefärbte und nicht mehr verformbare Hornhaut konnte jetzt mit Hilfe eines 9 mm Trepans aus dem in situ verbleibenden Kaninchenauge herausgestanzt werden. Etwa verbliebene Haftstellen wurden mit der Hornhautschere durchtrennt.
Nach nochmaligem Spülen unter einem weichen Strahl physiologischer NaCl-Lösung - wobei besonders das Endothel abgewaschen wurde - kam das vorfixierte Hornhautstückchen erneut für 60 min in ein Bad mit 3 %-iger GA-Puffer-Lösung.
Im Anschluß daran wurden die Präparate in reine Phosphat-Puffer-Lösung gebracht, die mittels eines Magnetrührers in Bewegung gehalten wurde. Auf diese Weise wurden die Gewebsstückchen mindestens 18 Stunden lang gespült.
Bis zur weiteren Verwendung konnten sie dann in kalter Puffer-Lösung (Kühlschrank) aufbewahrt werden.
Die weitere Verarbeitung der Präparate (Lyophilisieren und Bedampfen mit Gold im Vakuum) bis zur Betrachtung im Stereoscan blieb dieselbe wie in den vorhergehenden Versuchen.

Abb.: 9 EPITHEL Vergrößerung: 900 : 1
Auf der Aufnahme sind deutliche Zellkerne und Zellgrenzen zu erkennen. Etwas weniger scharf konturiert sieht man die Kerne der tiefer gelegenen Zellen.

Jetzt zeigte sich eine einwandfreie Aufsicht auf die inneren und äußeren Oberflächen der Hornhaut. Tränenfilm, Kammerwasser oder Fibrin fanden sich nicht mehr auf den Präparaten. (Abb. 9 - 11)
Die Abb. 9 zeigt eine glatte Epitheloberfläche mit einigen blasigen Eruptionen. Die Zellgrenzen sind deutlich sichtbar - sie verlaufen zum Teil über die Eruptionen hinweg.
Die Zellkerne sind als runde Erhebungen zu erkennen, wobei innerhalb einer Zellfläche mehrere Kerne erscheinen können. Dieser Befund ist so zu erklären, daß Kerne der tieferen Zellen sich durch die dünnere oberflächliche Schicht abzeichnen.

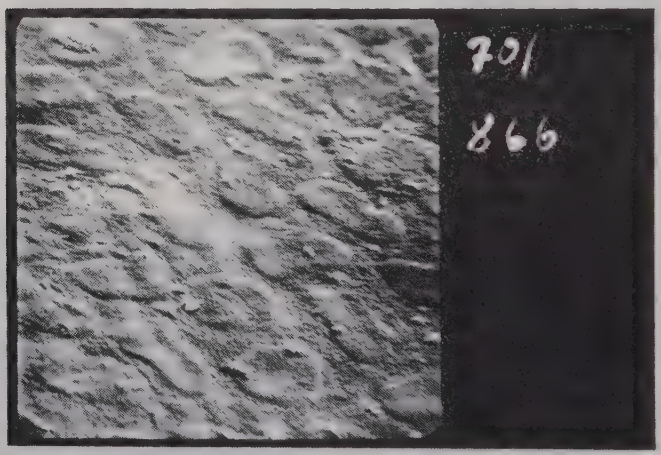


Abb.: 10 ENDOTHEL Vergrößerung: 1900 : 1
Auch bei diesem Präparat sind die Zellkerne als deutliche Erhebungen sichtbar. Im Gegensatz zum Epithel kann man jedoch keine Zellgrenzen sehen.

Die Abb. 10 und 11 zeigen die Endotheloberfläche. Auch hier sind die großen Zellkerne als erhabene Gebilde zu sehen, wobei jedoch die Zellgrenzen kaum zu erkennen sind. Lediglich auf der Abb. 11 wird durch den Verlauf der von oben nach unten durch die Bildmitte sich ziehenden Bruchlinie angedeutet, wo sich die Zellgrenzen befinden.

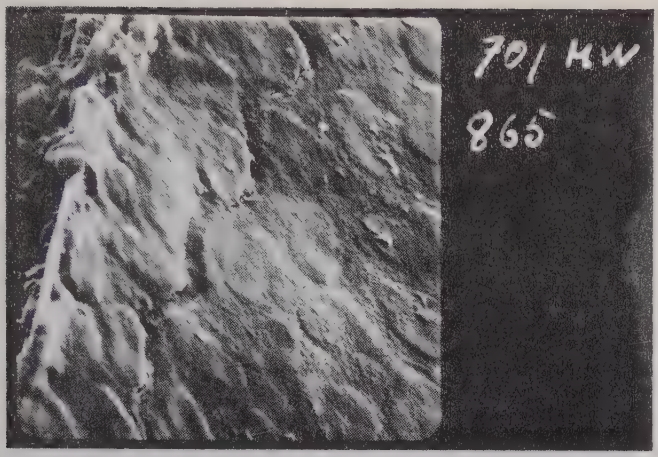


Abb.: 11 ENDOTHEL Vergrößerung: 1800 : 1

Die von oben nach unten durch die Bildmitte verlaufende Bruchlinie zeigt die sonst nicht sichtbaren Zellgrenzen an.

4. Versuch

Hierbei wurde dazu übergegangen, die mit GA vorfixierten Präparate mit Osmiumsäure nachzufixieren, um eine bessere Darstellung der Zellstrukturen zu bekommen.
Es wurde zunächst vorgegangen wie in Versuch 3.
Im Anschluß an das Auswaschen der Präparate in reiner Pufferlösung erfolgte nun die Nachfixierung mit OsO_4.
Dies wurde erreicht durch Lagerung der Gewebestückchen in Phosphat-Puffer-Lösung nach MILLONIG (pH 7,3) für 2 Stunden.

Die Abb. 12 zeigt die normale Cornea nach Vorfixieren mit 3 %-igem GA und Nachfixieren mit OsO_4. Die Oberflächen der Zellen und besonders die Zellgrenzen sind hier in ihren Konturen schärfer dargestellt. Außerdem sind auf dem Präparat ausgefallene Kristalle von Osmiumsäure zu erkennen.

Auf dem folgenden Bild (Abb. 13) fällt auf, daß diese Kristalle sich auf einigen Zellen besonders stark anhäufen,

Während auf anderen Zellen nur vereinzelt Kristalle nachweisbar sind.

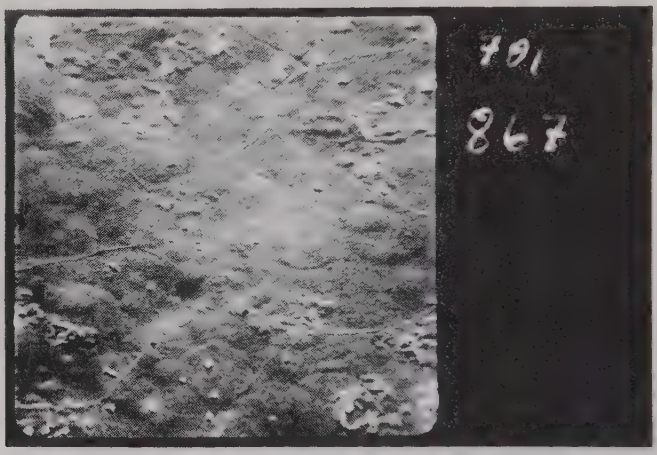


Abb.: 12 EPITHEL Vergrößerung: 1800 : 1

Epithelpräparat nach Nachfixierung mit OsO_4. Die Konturen der Zellgrenzen und der Zellkerne treten deutlicher hervor.

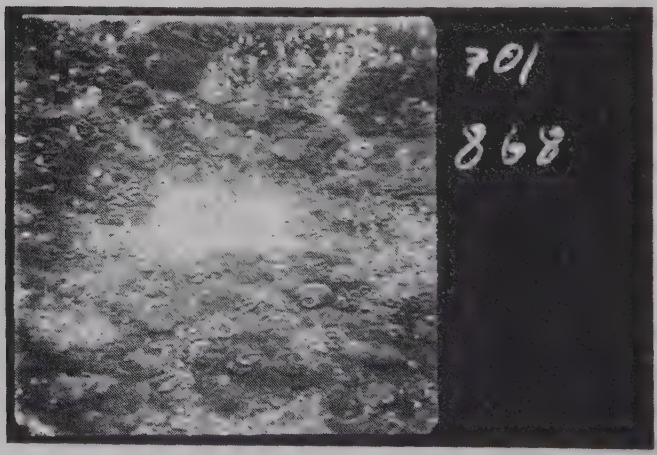


Abb. 13 EPITHEL Vergrößerung: 900 : 1

Einige Zellen zeigen eine stärkere Affinität zur Osmiumsäure, andere eine weniger starke.

Die Oberfläche des Endothels stellt sich sehr klar und deutlich dar. (Abb. 14) Die Zellkerne treten etwas stärker hervor, die Zellgrenzen sind etwas eingesunken. Möglicherweise handelt es sich hier um eine leichte Schrumpfung der Zellen.

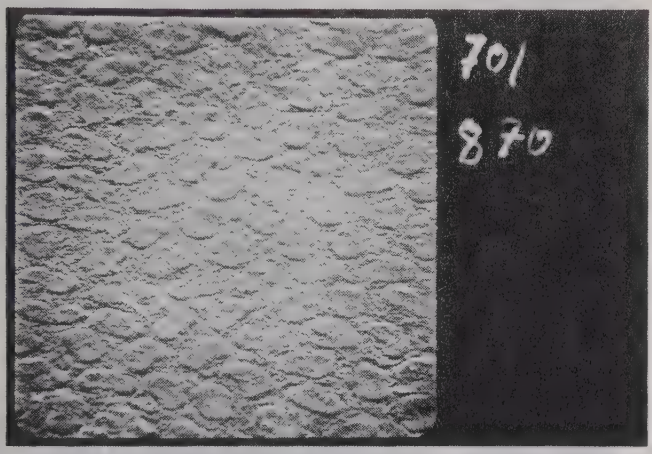


Abb.: 14 ENDOTHEL Vergrößerung: 900 : 1
Nach OsO_4-Nachfixierung stellen sich die Kerne des Endothels sehr deutlich dar. Die Zellgrenzen erscheinen etwas eingesunken.

Die folgenden Aufnahmen zeigen die Oberfläche eines Endothelpräparates, bei dem eine zufällig entstandene Läsion genauer untersucht wurde.
Abb. 15 zeigt diese Stelle bei einer Übersichtsvergrößerung des Präparates.
Man beachte die abgerissene Stelle am oberen Rand des Präparates (a), sowie die oberflächlich aufgeklappte Stelle darunter (b). Daran anschließend befindet sich ein Graben (c), der in einer krückenähnlichen Kurve endet (d).

Die folgende Aufnahme (Abb. 16) zeigt die aufgeklappte Stelle (b). Man erkennt deutlich den Endotheldefekt und daneben die Rückseite des abgelederten Endothellappens. Man sieht auf die

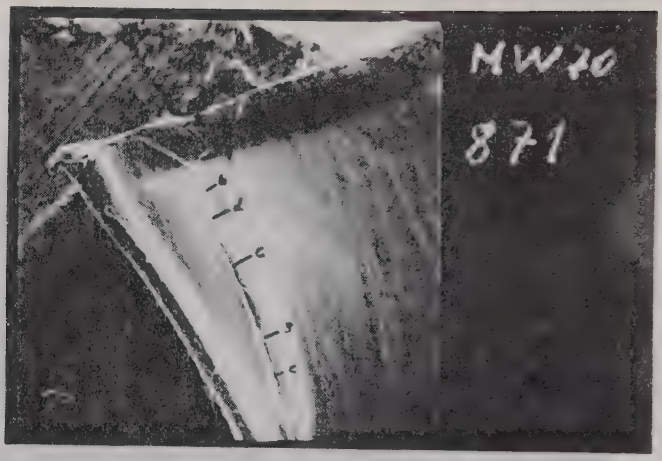


Abb.: 15 ENDOTHEL Vergrößerung: 90 : 1

Abb.: 16 ENDOTHEL Vergrößerung: 900 : 1

Die Endothelschicht ist umgeklappt, man erkennt die Rückseite des Endothellappens (a). Durch den Defekt sieht man auf die glatte Oberfläche der darunterliegenden Descemet'schen Membran (b).

glatte Oberfläche der Descemet'schen Membran.
Am rechten unteren Bildrand erkennt man die krückstockähnliche Kurve (d) in die der Graben (c) ausläuft. Die Verhältnisse unterhalb dieses Bogens zeigt Abb. 17.

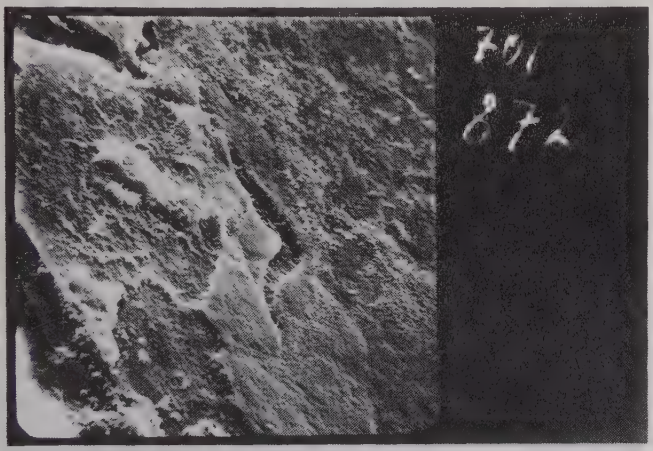


Abb.: 17 ENDOTHEL Vergrößerung: 1800 : 1
Hier sind ebenfalls die Endothelzellen entfernt;
auch hier sieht man auf die Descemet'sche Membran.

Auch hier ist die Endothelschicht abgeledert und man hat freie Sicht auf die Descemet'sche Membran.

Bei den folgenden Aufnahmen (Abb. 18 - 20) ist die defekte Stelle am oberen Rand des Übersichtspräparates (Abb. 15, a) stärker vergrößert worden.
Bei der Abb. 18 ist der Rand der schadhaften Stelle genauer eingestellt. (Abb. 15, 1)
Der Defekt ist hier deutlich tiefer als bei der bei Abb. 16 beschriebenen Endothelablederung. Sicher ist hier die Descemet'sche Membran mit entfernt worden. Man sieht also am Boden der Bruchstelle im oberen linken Bildteil die Konturen der Stromalamellen (A). Die Bruchkante gliedert sich deutlich in die

glatte breitere Descemet'sche Membran (B) und das schmale, unregelmäßig abgebrochene Endothel (C).
Im rechten unteren Bildteil zeigt sich die unverletzte Oberfläche des Endothels (D).
Die korallenstockartigen Konturen am Fuß des Descemet-Bandes halten wir für Cytoplasma, das aus den abgerissenen Endothelzellen ausgelaufen ist. (E).

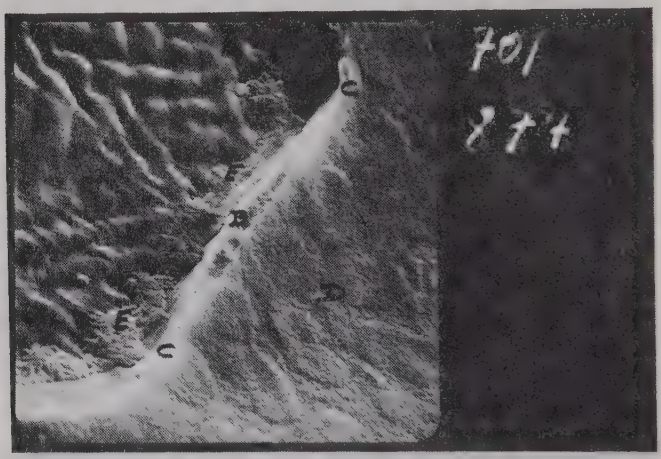


Abb.: 18 ENDOTHEL Vergrößerung: 1800 : 1
Beschreibung siehe Text. Siehe auch Abb. 15, 1

Aus einem anderen Einfallswinkel betrachtet, zeigen Abb. 19 und Abb. 20 besonders deutlich die Stufen des Endothels und der Descemet'schen Membran, sowie die Konturen des Stromas: die scherengitterartige Textur der Lamellen tritt deutlich hervor.

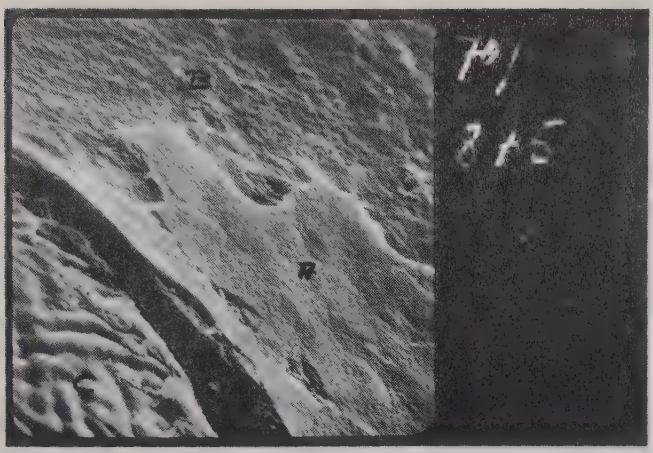


Abb.: 19 ENDOTHEL Vergrößerung: 1800 : 1

Diese Aufnahme entspricht Abb. 15, "2".
Deutliche Gliederung in Endothel (A), Descemet'sche-Membran (B) und Stroma (C)

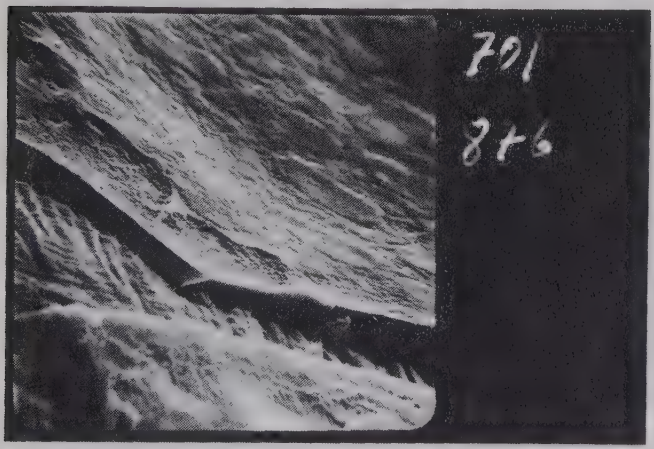


Abb.: 20 ENDOTHEL Vergrößerung: 2000 : 1

Hier ist die mit "3" bezeichnete Stelle des Grabens (c) (Abb. 15) dargestellt. Wie bei der vorherigen Aufnahme auch hier deutliche Trennung der Schichten.

5. Versuch

Da die ausgefallenen Osmiumsäurekristalle auf den Präparaten störten, mußte ein neuer Weg gefunden werden, Fixierung und Färbung des Gewebes zu erhalten, ohne die Hornhaut in direkten Kontakt mit der Osmiumsäure zu bringen.
Bei diesem Versuch gingen wir nun dazu über, nach erfolgter Vorfixierung durch GA die Präparate in einem feinen Netz in ein fest verschließbares Histologieglas zu hängen, dessen Boden gerade eben mit 1 %-iger OsO_4 (ca. 4 ml) bedeckt war. Auf diese Weise entwickelte sich durch die OsO_4-Dämpfe eine feuchte Kammer, in der die Präparate allseitig von den Dämpfen benetzt werden konnten.
Da die Osmiumsäure eine höhere Konzentration aufwies, konnte auch die Einwirkungszeit herabgesetzt werden; die Präparate blieben im Durchschnitt nur noch 60 min in der Kammer.
(Abb. 21 und Abb. 22)

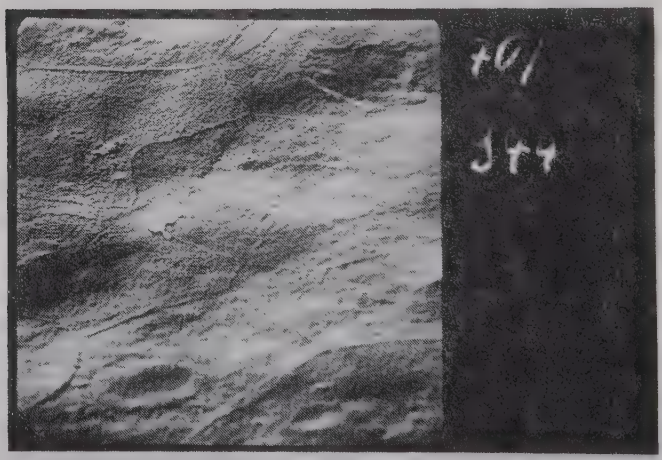


Abb.: 21 EPITHEL Vergrößerung: 2200 : 1
Die Epithelzellen sind gut zu erkennen; man sieht deutlich die Zellgrenzen und die Zellkerne. Auf der Oberfläche der Zellen sind die Mikrovilli deutlich zu sehen. OsO_4-Kristalle finden sich auf diesem Präparat nicht.

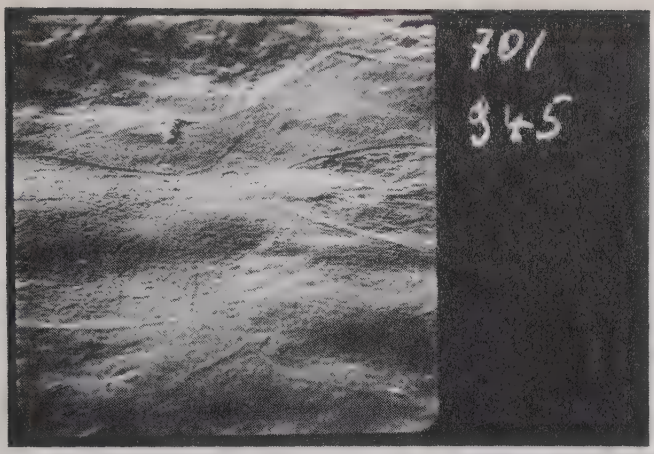


Abb.: 22 EPITHEL Vergrößerung: 2200 : 1
Gleiches Präparat wie Abb. 21, jedoch anderer Blickwinkel

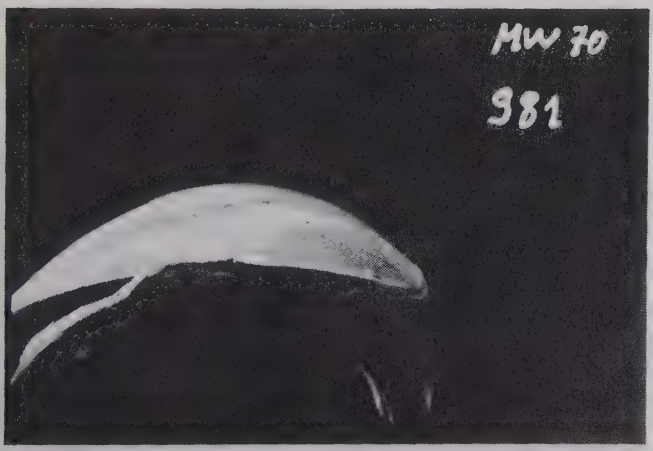


Abb.: 23 Vergrößerung: 20 : 1
Um einmal zu demonstrieren, wie schön bei den o. a. Fixations- und Präparationsmethoden die physiologische Hornhautkrümmung erhalten bleibt, zeigt diese Aufnahme ein Präparat in toto. Insgesamt ähneln die Präparate den flexiblen Haftschalen.

IV / B. Untersuchung der Cornea-Oberflächen nach Vereisung in vivo

6. Versuch

Hierbei sollte herausgefunden werden, ob und wie die Oberfläche des Endothels und des Epithels durch intensive Einwirkung von Kälte verändert wird.
Es sollte geprüft werden, welche Schäden an den Zelloberflächen der Cornea durch kurzes Einfrieren und Wiederauftauen entstehen. Um entsprechende Temperaturen schnell zu erhalten, benutzten wir flüssigen Stickstoff.
In einem Dewar - Gefäß wurde ein Metallstempel, der an seinem unteren Ende eine der Hornhautoberfläche entsprechende Krümmung aufwies, gekühlt.
Wenn dann der Stempel auf die Hornhaut des narkotisierten Tieres gebracht wurde, fror diese innerhalb von Sekunden zu einer porzellanweißen Halbkugel zusammen.
Nach Entfernen des Stempels taute die Cornea innerhalb von etwa 1 - 2 min vom Rand her wieder auf.
Im Anschluß daran wurde die Cornea wie unter Versuch 5 beschrieben weiterbehandelt, weil wir diese Methode der Fixation nach unseren Versuchen für die Beste hielten.
Nach der Vereisung sind im Epithel die Zellgrenzen zwar gut sichtbar (Abb. 24), es sind auch keine Schrumpfungszeichen zu sehen, jedoch sind die Zellkerne kaum dargestellt und auch die Mikrovilli sind nicht so gut zu erkennen wie bei gleicher Vergrößerung in der normalen Cornea (Abb. 21 und 22).
In der Mitte der Abb. 24 scheint eine Zelle zu fehlen, ebenso oben rechts im Bild.

Bei der Abb. 25 scheint die Zelloberfläche noch glatter zu sein. Hier sieht man ganz deutlich den Effekt nach Herausreißen einer Zelle aus dem Gewebsverband. In Bildmitte scheint noch der Rest der herausgerissenen Zelle an einer Ecke festzuhängen und umgeklappt auf der Oberfläche zu liegen.
Auch am Endothel waren Veränderungen infolge der Vereisung nachweisbar, wie auf den folgenden Aufnahmen gezeigt werden

Abb.: 24 EPITHEL Vergrößerung: 2000 : 1

Cornea nach Vereisung. Zellgrenzen sind noch recht gut zu erkennen, dagegen sieht man kaum Zellkerne. Ebenso sind die Mikrovilli nur andeutungsweise zu erkennen.

Abb.: 25 EPITHEL Vergrößerung: 2000 : 1

Cornea nach Vereisung. Der Lappen in Bildmitte scheint der noch festhängende Rest einer Zelle zu sein, die aus dem Gewebsverband herausgerissen wurde.

kann. Damit wäre auch ausgeschlossen, daß es sich beim Epithel um rein mechanische Hornhautläsionen handeln könnte.
Bei der 2000-fachen Vergrößerung sieht nach der Vereisung die Oberfläche des Endothels - verglichen mit einem normalen Auge - sehr unregelmäßig konturiert aus. (Abb. 26) Zellgrenzen sind nicht dargestellt und auf der Oberfläche zeigen sich kleinere Defekte. Es scheint, als ob die Zellmembranen des Endothels durchlöchert sind, Cytoplasma ausgetreten und der Zellkörper etwas eingesunken ist.
In Bildmitte fehlen ganze Endothelzellen. Durch diesen Defekt sieht man die glatte Descemet - Oberfläche.
Bei stärkerer Vergrößerung treten die oberflächlichen Defekte der Zellen noch deutlicher hervor (Abb. 27).
Auch in anderen Präparaten (Abb. 28 und 29) sind solche Veränderungen sichtbar.

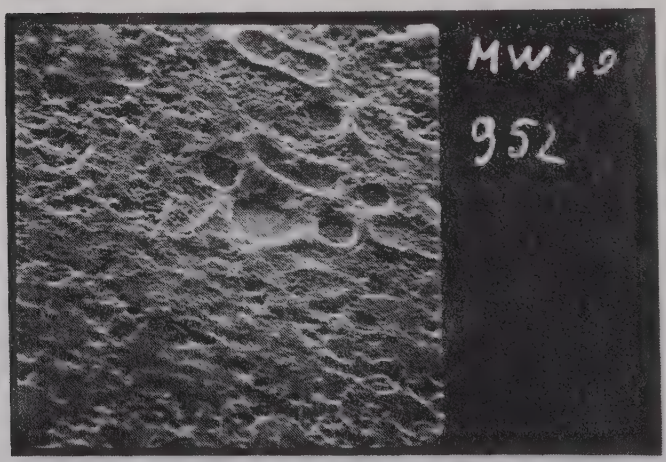


Abb.: 26 ENDOTHEL Vergrößerung: 2000 : 1

Cornea nach Vereisung. Die Endotheloberfläche sieht sehr unregelmäßig konturiert aus und es zeigen sich kleinere Zelldefekte. In Bildmitte sind ganze Zellen aus ihrem Verband herausgerissen.

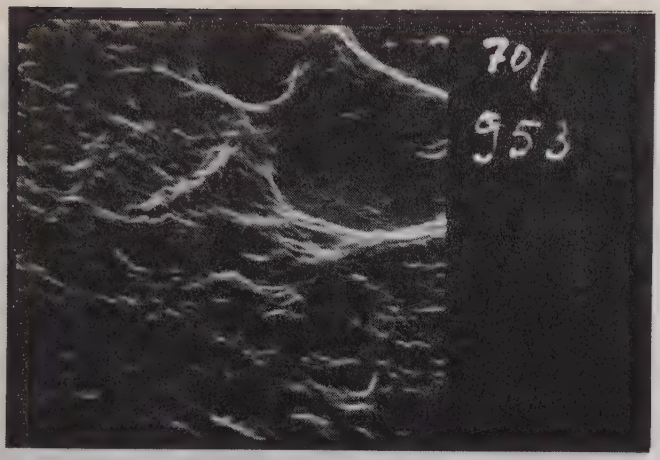


Abb.: 27 ENDOTHEL Vergrößerung: 5ooo : 1

Das gleiche Präparat wie Abb. 26, jedoch stärker vergrößert.
Durch die herausgerissenen Zellen kann man auf die Oberfläche der darunterliegenden Descemet - Membran sehen.

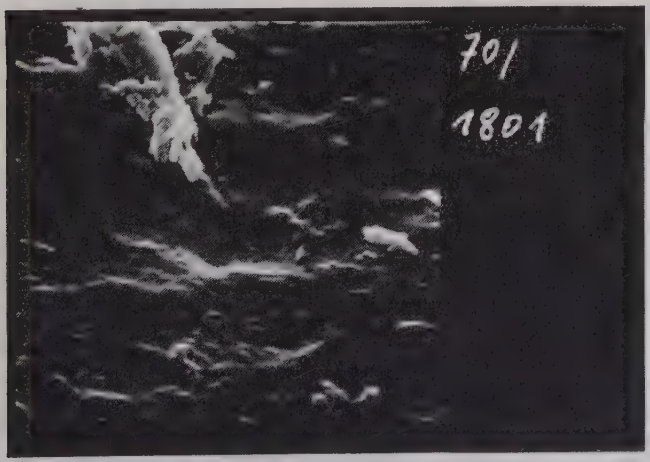


Abb.: 28 ENDOTHEL Vergrößerung: 5ooo : 1

Cornea nach Vereisung. Auch bei weiteren Präparaten zeigen sich Stellen, an denen Zellen aus der Oberfläche herausgerissen scheinen.

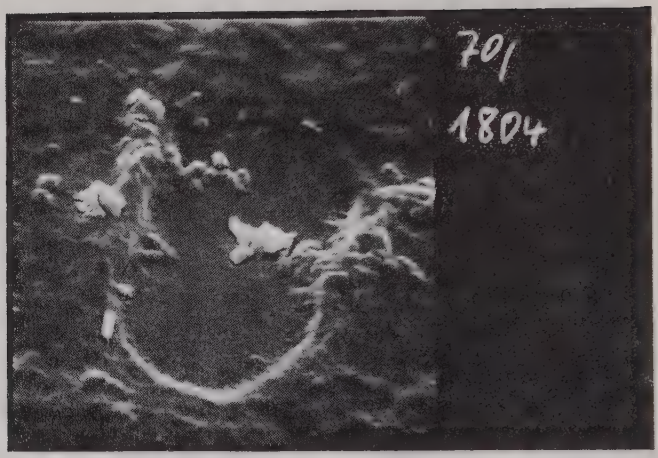


Abb.: 29 ENDOTHEL Vergrößerung: 5000 : 1

Cornea nach Vereisung. Auch hier kann man auf dem Grund des Defektes die Descemet'sche - Membran erkennen.

V. DISKUSSION

Nachdem mit verschiedenen transmissionselektronenmikroskopischen Arbeiten (TANAKA 1964; TOST, FUHRMEISTER und SCHULZE 1965; FAURE 1971; POULIQUEN 1971) und mit biochemischen Arbeiten (REIM und SCHMIDT 1967; REIM, LIPP und VENSKE 1970; REIM, BOECK, KRUG und VENSKE 1972) Kälteveränderungen in der Cornea dargestellt wurden - z. B. Schädigung der Zellorganellen in Epithel und Endothel, und Ruptur der äußeren und inneren Membranen - werden jetzt auch rasterelektronenmikroskopische Befunde der Epithel- und Endotheloberflächen nach Kälteeinwirkung vorgelegt.
Da die Darstellung von Zelloberflächen häufig verfälscht wird durch Verunreinigungen, Quellungs- und Entquellungserscheinungen oder durch mechanische Läsionen, mußte zuerst eine Methode gefunden werden, die am ehesten die in-vivo-Struktur nach Fixierung beibehält.
Dabei zeigte es sich, daß die in-vivo-Beträufelung mit Glutaraldehyd-Puffer-Lösung allen anderen Verfahren - auch einer Perfusion der Vorderkammer mit Glutaraldehyd überlegen war. Auf diese Weise konnte die Cornea bei normalem intraocularem Druck ohne robuste Druckänderung und ohne größere mechanische Läsionen fixiert werden.
Fixation in Glutaraldehyd, Kontrastierung mit Osmiumsäure, sorgfältige Waschvorgänge sowie allergrößte Sauberkeit bei allen Arbeitsgängen und schonende Lyophilisierung führten dann zu Präparaten, die frei von Artefakten schienen.

Die Einwirkung einer kurzen Vereisung läßt sich bei der Darstellung des Oberflächenreliefs deutlich machen. Sowohl im Epithel als auch im Endothel sind oberflächliche und tiefe Gewebsdefekte zu erkennen. Teilweise sind auch ganze Zellen aus dem Gewebsverband herausgerissen. Im Vergleich zu normalen Epithel- und Endotheloberflächen, die parallel zu den Vereisungsexperimenten hergestellt wurden, sind die Kälteeffekte deutlich.

Nach diesen Ergebnissen kann also die erhöhte Durchlässigkeit von Epithel und Endothel, wie auch die leichte Brüchigkeit ihrer Struktur allein auf einer mechanischen Läsion beruhen. Es entstehen nach einer Vereisung regelrechte Löcher im Zellverband, die als Ursache für die vermehrte Permeabilität und das daraus resultierende Corneaödem angesehen werden.

Es scheint auf einigen Bildern des Endothels vor allen Dingen, daß die Einwirkung der Kälte zu regelrechten Eruptionen führt. Möglicherweise werden ganze Zellen oder auch mehr oder minder große Zellteile aus dem Gewebsverband herausgesprengt.
Die hier festgestellten Läsionen zeigen also neue Veränderungen durch die Kälte.
Bei den histologischen und transelektronenmikroskopischen Untersuchungen traten nach Kälteversuchen sowohl im Epithel als auch im Endothel folgende Strukturveränderungen auf: intrazelluläres Ödem, Ruptur von Kernen und Mitochondrien, Quellung des Endoplasmatischen Retikulums, sowie eine Auflösung der Zellorganellen überhaupt. (TOST, FUHRMEISTER und SCHULZE 1965; SOMMERVILLE und SHEA 1966; FAURE 1971; POULIQUEN 1971). Im biochemischen Bereich fand man eine Insuffizienz der Energiebildung, eine Verminderung des Glucoseverbrauchs und eine Abnahme der Lactatbildung. (REIM und SCHMIDT 1967; REIM, BOECK, KRUG und VENSKE 1972).

Die hier im Oberflächenrelief dargestellten Veränderungen lassen daran denken, daß zusätzlich zu den Zerstörungen, die durch die Transelektronenmikroskopie und die biochemischen Untersuchungen beschrieben wurden, auch ganze Zellen oder doch zumindest größere Zellanteile mechanisch aus dem Gewebsverband herausgeschleudert und Zellen durch Eruption einzelner Teile zerstört werden.

Betrachtet man diese Veränderungen, so ist man erstaunt, daß im Experiment und auch in der Klinik das Corneaödem nach einigen Tagen wieder verschwindet.
Demnach muß man eine Wiederherstellung der Zellgrenzflächen

der Cornea annehmen. Dieses scheinen auch andere Untersuchungen zu bestätigen, da man auch in den entsprechenden histologischen und elektronenmikroskopischen Bildern eine restitutio ad integrum wenige Tage nach einer Vereisung in vivo beobachten konnte. (TOST, FUHRMEISTERund SCHULZE 1965; REIM und SCHMIDT 1967; FAURE 1971; POULIQUEN 1971)

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Seit etwa 50 Jahren wird Kälte in der Ophthalmologie in der Therapie angewandt. Dabei ist es interessant zu erfahren, ob und welche Veränderungen durch diese Kälteanwendung z.B. an der Hornhaut hervorgerufen werden. Dies vor allen Dingen auch deswegen, da beobachtet wurde, daß auch nach kurzfristiger Hornhautvereisung ein Ödem entsteht und speziell das Endothel verstärkt durchlässig für Kammerwasser wird.

Um zu den schon vorhandenen biochemischen und histologischen Untersuchungen noch die Optischen hinzuzufügen, wurden die angefertigten Präparate mit einem Elektronenstrahl - Rastermikroskop untersucht. Hierzu mußte zunächst eine Präparationsmethode zur genauen Darstellung von Epithel und Endothel gefunden werden, bevor die Hornhaut auf Kälteschäden untersucht werden konnte.
Als einfachste und beste Methode wurde die "in-vivo-Fixation" angesehen, wobei auf die Cornea des narkotisierten Kaninchens i n s i t u tropfenweise Glutaraldehyd aufgebracht wurde.
Der Einfluß von tiefen Temperaturen auf die Hornhaut wurde mittels eines in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallstempels erprobt.
Bei diesen Versuchen fiel auf, daß beim Epithel die Zellgrenzen noch relativ gut zu sehen, Zellkerne oder Mitochondrien dagegen kaum zu erkennen waren. Zudem schienen hier und da größere Zellteile, bzw. ganze Zellen zu fehlen.
Beim Endothel waren die Effekte deutlicher. Hier war der Anteil der Zellen, die aus ihrem Verband herausgerissen schienen, erheblich größer. Bei den übrigen Zellen hatte es den Anschein, als ob die Zellmembranen durchlöchert, Cytoplasma ausgetreten und die Zellkörper eingesunken wären.

Verglichen mit den parallel hergestellten normalen Epithel-

und Endothelpräparaten sind diese durch die Kälte bedingten Effekte deutlich. Somit wären auch die erhöhte Durchlässigkeit von Epithel und Endothel und damit auch das nach dem Vereisen auftretende Ödem zu erklären.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

AONO, H.:
"Electr. micr. studies on the cornea. I.
On epithelial cell layer"
Fol. ophthal. jap. 12, (1961)

- "Electr. micr. studies on the cornea. II. On parenchymatous layer, endothelial layer and Descemet's membrane"
Fol. ophthal. jap. 12, (1961)

BAUD, C. A. and BALAVOINE, C.:
"L'ultrastructure de la membrane de Descemet et de ses dérivés pathologiques. (Stries hyalines)"
Ophthalmologica (Basel) 126, S. 290-294 (1952)

BINDER, R.:
"Überlegungen zur Lebensdauer der Zellen im Hornhautepithel"
Wien. Klin. Wschr. 64, 978 (1952)

BLÜMKE, S. und MORGENROTH, K. jr.:
"The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea"
J. Ultrastructure Res. 18, (1967) S. 5o2

CALMETTES, L., DEODATI, F., PLANEL, H. et BEC, P.:
"Etude histologique et histochemique de l'epithelium anterieur de la cornée et de ses basales"
Arch. Ophthal. Paris 16, (1956)

CHESKES, A. and HENDERSON, J. W.:
"Invivo freezing of the cornea: an experimental study"
Invest. Ophthal. 5, 325 (1966 a)

CHI, H. H. and KELMAN, C. D.:
"effects of freezing on ocular tissues. I. Clinical

and histologic study of corneal endothelium"
Amer. J. Ophthal. 61, 630 (1966)

CHRISTENHUSS, R., LINDSTRÖM, M., ZIEGLER, W.:
"Ein Elektronenstrahl-Rastermikroskop a. d. Philipps-Universität"
"Mitteilungen-Kommentare-Berichte" der Ph. Univ. Marburg, Dez. 1969

DAVSON, H.:
"The Eye", Vol. I,
Academic Press: New York and London 1962

FAURE, J. P., GRAF, B. et KIM, Y. Z.:
"Formation des cellules géantes au cours de la régéneration de l'endothelium cornéen après déstruction par le froid", Zit. in Moreau et Haut "Cryo-Ophtalmologie", Masson et C^{ie}, Paris (1971)

FEHER, J. und VALU, L.:
"Über die Struktur der Descemet - Membran"
Graefes Archiv klin. exper. Ophthal. 179, (1969)

HANNA, C. und O'BRIEN, J. E.:
"Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea"
Arch. Ophthal. N.Y. 64, (1962), Zit. von MAURICE in "The EYE" (Ed. Davson), Acad. Press London, N.York 1962

HOFFMANN, F. und BAUSCHKE, D.:
"Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Keratitis photoelektrica"
Ber. Dtsch. Ophthal. Ges. 72, (1971)

- und DUMITRESCU, L.:
"Beobachtungen der Kaninchenhornhaut unter dem Raster-Elektronenmikroskop"
Beitr. Elektronenmikr. Direktabb. Oberfl. 3, (1970)

JAKUS, M. A.:
"Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane"
J. biophys. biochem. Cytol. 2, (1956) S. 243 - 252

JAKUS, M. A.:
"The fine structure of the human cornea"
In:"The structure of the eye" (ed. G.K. Smelser)
New York: Academic Press 1961 S. 343

KAYE, G. J. and G. D. PAPPAS:
"Studies of the cornea. I. Fine structure of the rabbit cornea and the uptake and the transport of colloidal particles by the cornea in vivo"
J. Cell Biol. 12, (1962) S. 457

KRWAWICZ, T.:
"The use of low temperature in the treatment of iridocyclitis and of herpetic infections of the cornea". Trans. Ophthal. Soc. Un. Kingdom, Vol. LXXXVIII (1968/69) S. 137

MAUMENEE, A. E. und KORNBLUETH, W.:
"Regeneration of the corneal stroma cells. I. Technique for destruction of normal corpuscels by application of solidified (frozen) carbon dioxide"
Amer. J. Ophthal. 31, 699 (1948)

- und -
"Regeneration of the corneal stroma cells. II. Reviev of literature and histologic study"
Amer. J. Ophthal. 32, 1051 (1949)

MILLONIG, G.:
"Further observations on a phospate buffer for osmium solutions in fixation"
V. Internat.Congr.EM Philadelphia Vol.II (1962), P - 8

MOREAU, P. G., HAUT, J. et al.:
"Cryo - Ophtalmologie"
Masson et C^{ie}, Editeurs, Paris (1971)

PEDLER, C.:
"The fine structure of corneal epithelium"
Exp. Eye Res. 1, (1962)

POULIQUEN, Y., HAUT, J., GRAF, B. et BISSON, J.:
"Etude structurale et ultrastructurale de la cornée après congélation expérimentale", Zit. in: Moreau et Haut:"Cryo-Ophtalmologie", Masson et C^{ie}, Ed., Paris(1971)

REIM, M., MEYER, D. und CATTEPOEL:
"Über die Bedeutung des Frierstopverfahrens für den in vivo-Status der Metabolite im Corneaepithel"
Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal.174, 97(1967)

- and SCHMIDT, F.:
"Biochemische Veränderungen bei der Vereisung der Hornhaut in vivo. Ein Beitrag zur Kältetherapie"
Kl. Mbl. Augenheilk. 150/1, 96-103 (1967)

- LIPP, U. and VENSKE, G.:
"Biochemical changes in the cornea after cryotherapy"
Ophthalmology XXI Int. Congress Mexico 1970, Part I, 550

- BOECK, H., KRUG, P. and VENSKE, G.:
"Aqueous humour and cornea stroma metabolite levels under various conditions"
Ophthal. Res. 3, 241 (1972)

REIMER, L.:
"Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden"
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1967, 2.Aufl.

ROHEN, J. W.:
"Das Auge und seine Hilfsorgane"
In: "Handbuch der mikroskopischen Anatomie"
(Ed. W. v. Möllendorf u. W. Borgmann) Bd. III/4
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1964

SCHWARZ, W.:
"Elektronenmikroskopischen Untersuchungen über den Aufbau der Sklera und der Cornea des Menschen"
Z. Zellforsch. 38, 26 (1953)

-
"Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Differenzierung der Cornea und Sklerafibrillen des Menschen"
Z. Zellforsch. 38, 78 (1953)

SOMMERVILLE, G. M. and SHEA, M.:
"Effect of freezing of the corneal endothelium"
Amer. J. Ophthal. 62, 979 (1966 a)

STAUBESAND, J.:
"Zum Feinbau des Corneaendothels"
Verhandl. Anat. Ges. 57 (1962)

STRAUB, W.:
"Über Anwendungsmöglichkeiten der Kälte in der Ophthalmologie"
Klin. Monatsbl. Augenheilk. 144, (1964)

- "Kälteschäden und Kältetherapie des Auges"
Klin. Monatsbl. Augenheilk. 147, 167 (1965)

- und REIM, M.:
"Die Anwendung von Kälte in der Ophthalmologie"
Marburger Universitätsbund Jahrbuch 1966/67

SUDARSKY, R. D., HULQUIST, R. and CHI, H. H.:
"Cryogenically induced iris atrophy, iridectomy and cataract in rabbits"
Amer. J. Ophthal. 60, 217 (1965)

TANAKA, N.:
"Electron microscopic study on refrigerated cornea"
Acta Soc. Ophthal. jap. 67, 685 (1963)
Zbl. O. 90, 171 (1964)

TENG, C. C.:
"Fine structure of the human cornea: epithelium and stroma"
Amer. J. Ophthal. 54, 969 (1962)

TILGNER, S., HEYDENREICH, A., ECKERT, K.:
"Über Vorkommen, Merkmale und Verteilung sog. "polygonaler Zellen" im Hornhautepithel"
Graef. Arch. klin. exp. Ophthal. 178, 367 (1969)

TOST, M., FUHRMEISTER, H., SCHULZE, F.:
"Experimenteller Beitrag zur Kälteeinwirkung am Auge"
Klin. Mbl. Augenheilk. 146, 1 (1965)

- SCHULZE, F. und SELISKO, G.:
"Zur Kälteschädigung des Hornhautendothels. Untersuchungen am Häutchenpräparat"
Ophthalmologica Basel 155, 87 (1968)

WESSELY, K.:

"Zur Frage der Kälteschädigung der Hornhaut"

Arch. Augenheilk. 83, 1 (1918)

Lebenslauf

Am 30. November 1946 wurde ich in Brilon-Wald als einziges Kind der Eheleute Ewald und Erna Pinkerneil - geb. Förster - geboren.
Nach der Scheidung meiner Eltern im Sommer 1950 nahm meine Mutter ihren Mädchennamen wieder an, den ich am 7. Juni 1952 ebenfalls bekam.
Nach vier Volksschuljahren (1953 - 1957) wechselte ich auf das neusprachliche Gymnasium - Petrinum in Brilon über, wo ich am 9. Februar 1966 die Reifeprüfung bestand.
Im April 1966 begann ich an der Philipps - Universität in Marburg das Studium der Medizin, das ich im Dezember 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.
Seit Januar 1973 bin ich als Medizinalassistentin im Kreiskrankenhaus Frankenberg/Eder tätig.

Im Januar 1972 heiratete ich den Medizinalassistenten Dr. med. Holger Boeck.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Reim für seine Themenstellung, seine Anleitungen und seine freundliche Unterstützung.
Herrn Prof. Dr. med. W. Straub danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit.
Herrn Dr. rer. nat. R. Christenhuß danke ich für seine bereitwillige Hilfe bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen und für die photographischen Dokumente.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bommer, Buchholz, Dimroth, Dölle, Engelhardt, Exner, Friederich, Ganz, Graul, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrand, Hort, Hupe, Jacob, Karlson, Klaus, Koecke, Koransky, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Mattes, Nesswetha, Nultsch, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Spiegelberg, v. Stosch, Straub, Strohmeyer, Voss, Walcher, Wendt.